



Н.С. Гурина

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПЫЛЬЦЫ РАСТЕНИЙ КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АЛЛЕРГЕНОВ

Витебский государственный
медицинский университет

Проведено изучение подлинности и доброкачественности смеси пыльцы древесных растений, наиболее аллергенных для Белоруссии. Установлены микроскопические признаки пыльцы и примесей, показатели влажности, зольности, содержания биологически активных веществ и белка.

Рост аллергических заболеваний, вызванных природными аэроаллергенами, вызывает необходимость поиска рациональных подходов к их диагностике, профилактике и лечению, что предполагает, с одной стороны – изучение источников и разнообразия аэроаллергенов, с другой – создание диагностических и лекарственных средств на их основе. Значительное место среди аэроаллергенов занимают пыльца растений и споры грибов. При контакте с ними у людей возникают аллергические заболевания – поллинозы, экологическая обусловленность которых в настоящее время не вызывает сомнения. Особую остроту приобретает эта проблема в связи с дальнейшим загрязнением окружающей среды.

Таксономическое разнообразие и количественный баланс пыльцы и спор в воздухе зависят от природно – климатических условий: характера растительного покрова, пылевой продуктивности растений, режима метеорологических факторов. Поэтому поллинозы относятся к группе заболеваний, имеющих исключительно региональный характер, а «их распространение следует изучать как процесс географического и биогеометеорологического плана» [2].

Постоянное увеличение числа больных поллинозами отмечается во всём мире и особенно быстро в экологически развитых странах. В США, по данным Национального института аллергии, число больных поллинозом составляет более 6 % населения, в европейских странах – от 0,5 до 5 %, а в Швейцарии, Австрии, Франции – до 10 % населения [1,3,4]. В разных регионах содружества Независимых Государств поллинозами страдают от 0,1 до 5 % населения [5].

Анализ частоты встречаемости поллинозов в Беларуси показывает на их прогрессивный рост: если в 1986 году они отмечались у 1-5% аллергологических больных, то в 2000 году их число возросло до 14-15% (5). При этом все авторы отмечают тяжесть и длительность заболеваний, трудность постановки диагноза, а следовательно и лечения. Это связано в первую очередь с тем, что для диагностики и лечения традиционно используется стандартный набор пылевых аллергенов, изготавливаемый Ставропольским НИИВС, который не включает диагностических препаратов пыльцы и спор, характерных для растительности республики, что, по-видимому, и объясняет их низкую диагностическую эффективность. Установлено, что аллергены, изготовленные даже из одноимённой пыльцы, собранной в различных регионах, отличаются по степени аллергенной активности [5].

Поэтому на сегодня особенно актуальной является задача создания национального банка региональных аллергенов и их отечественное производство. Это предполагает в первую очередь изучение спектра региональных аэроаллергенов, с другой – разработка нормативной документации на пыльцу растений как сырьё для получения аллергенов.

Анализ спорово-пылевых спектров воздуха, полученных нами ранее, позволил определить перечень растительных аэроаллергенов для всех регионов Беларуси, которые распределились в три группы.

Первую группу составляет пыльца древесных растений, вторую – травянистых, третью – споры грибов.

Для установления перечня пыльцы, обладающей наиболее выраженными аллергенными свойствами в Беларуси, нами было проведено изучение частоты положительных реакций с пыльцевыми аллергенами путем анкетирования больных во всех областных аллергологических центрах Республики Беларусь. Установлено, что в 94,1% случаев наблюдается поливалентная сенсibilизация к пыльце, причем у 79,5 – 86,4% наблюдается полисенсibilизация к пыльце злаков (мятлика, овсяницы, ежи, райграсса) и у 49,8 – 77,4% - к пыльце древесных растений (ольхе, березе, лещине, сосне, ели, тополю). Это позволило разработать две прописи так называемых сложных или микст-аллергенов: первая – смесь пыльцы древесных растений – березы повислой и бородавчатой, ольхи обыкновенной, сосны обыкновенной, лещины обыкновенной в равных соотношениях; вторая – смесь пыльцы злаков – овсяницы, райграсса, ежи, тимopheевки в равных соотношениях.

Целью настоящей работы явилось фармакогностическое изучение смеси пыльцы растений, состоящей из пыльцы березы, ольхи, сосны и лещины для разработки показателей подлинности и доброкачественности ее как сырья для получения диагностических и лечебных аллергенов.

Задачи исследования:

1) Разработать показатели подлинности сырья:

- определить макроскопические признаки смеси пыльцы;
- определить микроскопические признаки смеси пыльцы;
- провести качественное определение химического состава смеси пыльцы ;

2) Установить критерии доброкачественности сырья:

- определить показатели влажности пыльцы;
- определить содержание золы в сырье;
- провести стандартизацию сырья по содержанию белкового азота.

Сбор пыльцы проводили путём заготовки мужских соцветий ольхи серой и клейкой, березы пушистой и бородавчатой, лещины обыкновенной и мужских шишек сосны за 2 – 3 дня до массового пыления во всех областных центрах Белоруссии в 2001, 2002, 2003 г.г., укладывали их на пергаментную бумагу и после высушивания при комнатной температуре производили обмолот. Полученную пыльцу просеивали через сито 0,25 мм, помещали в стеклянные флаконы из тёмного стекла с притёртой пробкой и хранили при температуре 4°C.

Микроскопические исследования нативной пыльцы проводили в глицерине и спирто – глицериновой смеси на микроскопе МБР – 1 при увеличении 40*15 (глицерин – желатин) и на микроскопе МБР – 15 при увеличении 90*15 (иммерсия). Для идентификации пыльцевых зерен использовали также ранее полученные данные на сканирующем электронном микроскопе при увеличении 1:20000.

Влажность была определена согласно методике ГФ XI. Температура сушки составила 38 – 41°C в соответствии с ГОСТ 28887 - 90 на цветочную пыльцу (обножку).

Кроме того, разработана методика определения влажности пыльцы при комнатной температуре, позволяющая полностью исключить инактивацию при повышенных температурах белков, которые являются аллергенами.

Определение золы в пыльце древесных растений проводили согласно методике ГФ XI.

Качественные реакции обнаружения биологически активных веществ проводили по общепринятым методикам.

Количественное определение белка проводили методом Бредфорда. Измерение оптической плотности проводили на СФ-46.

Определение подлинности сырья Макроскопические признаки пыльцы

Смесь пыльцы представляет собой желтый, легко сыпучий, пылевидный порошок, без вкуса и запаха.

Микроскопические признаки пыльцы

Использовался следующий порядок описания пыльцы, принятый в 1965 г. в г. Новосибирске на II Всесоюзной палинологической конференции:

Alnus sp. – Пыльцевые зерна (п.з.) четырёх - , пятипоровые, в очертании с полюса четырёх -, пятиугольные, с экватора – широкоэллиптические; п.о. 18,0 мкм; э.д. 23,4 – 27,5 мкм. Поры экваториальные, сильно выступают над поверхностью п.з., диаметром 8,5 мкм, округлые. Расстояние между порами 8,5 мкм. Экзина 1,7 – 2,0 мкм толщиной; скульптура слабо заметная.

Betula sp. – П.з. трёхпоровые, шаровидные; в очертании с полюса округлые или округло – треугольные, с экватора – широкоэллиптические; п.о. 22,4 мкм; э.д. 25,2 – 27,0 мкм. Поры резко приподнимаются над общей поверхностью зёрен, диаметром 6,8 – 9,3 мкм; округлые или овальные с ободком. Экзина 1,7 – 2,0 мкм; скульптура мелкобугорчатая.

Corylus avellana L. – П.з. трёхпоровые, в очертании с полюса трёхугольные, с экватора – широкоэллиптические; п.о. 19,8 мкм, э.д. 21,6 – 23,4 мкм. Поры крупные, полого приподнимаются над общей поверхностью зерна, округлые, 2,5 мкм в диаметре, без ободка. Экзина 2,7 мкм. Структура незаметная.

Pinus sylvestris L. – П.з. с воздушными мешками, в очертании с полюса эллиптические, широкоэллиптические или округлые; в полярном положении: ширина п.з. 77,8 – 87,5 мкм; ширина тела 46,7 – 56,0 мкм, длина тела 31,0 – 50,0 мкм; ширина воздушных мешков 25,0 – 31,0 мкм, длина – 32,5 – 50,0 мкм; воздушные мешки образуют прямой или острый угол у места их прикрепления, довольно резко отчленены от тела. Экзина мешков имеет ячеистое строение.

В качестве примеси к нормально развитым описанным выше пыльцевым зернам можно считать морфологически измененные пыльцевые зерна. В рассмотренной пыльце выделено 3 разновидности морфологических изменений: 1 – загрязнённые п.з. с чётко заметными на поверхности чужеродными частицами, 2. – разорванные п.з. с трещинами, оторванными

частями, разрывами экзины или апертур; 3 – деформированные – недоразвитые или сросшиеся п.з., имеющие структуры, не свойственные данному виду пыльцы (выросты различной величины и формы). Указанные морфологические изменения были установлены нами в микст-аллергенах, составленных из пыльцы, собранной во всех областных центрах Республики Беларусь за 2000 г. Данные представлены в таблице 1.

Анализ полученных данных позволяет утверждать, что до 21% морфологически измененных пыльцевых зерен может присутствовать в смеси пыльцы для приготовления аллергенов. Поскольку основные пыльцевые аллергены локализованы в спородерме, изменение её структуры обязательно скажется на аллергенной активности, усиливая последнюю [7]. В этой связи возникает необходимость нового подхода к изучению аллергенной пыльцы, т.к. п.з. с изменённой морфологической структурой будут отличаться и своей аллергенной активностью.

Обнаружение различных групп биологически активных веществ (БАВ)

Для обнаружения БАВ использовали смесь пыльцы берёзы бородавчатой, ольхи серой, лещины обыкновенной, сосны лесной в соотношении 1:1:1:1, собранной в окрестностях г. Витебска (п. Улановичи) в 2002 году. Были проведены следующие химические реакции:

Качественные реакции на кумарины

Приготовление извлечения

0,25 г сырья смеси пыльцы помещали в колбу ёмкостью 25 мл, приливали 2,5 мл 96% спирта и нагревали с обратным холодильником на водяной бане до кипения 15 минут. Извлечение охлаждали и отфильтровывали в пробирку.

Лактонная проба

К 2 мл спиртового извлечения прибавляли 0,5 мл 10 % спиртового р-ра NaOH. Раствор нагревали на водяной бане до кипения и охлаждали. Раствор приобретает желтую окраску, т.к. произошел разрыв лактонного кольца, образовались кумарины, имеющие желтое окрашивание.

Затем в пробирку прибавили 4 мл воды, перемешали. Жидкость в пробирке стала прозрачной, т.к. кумарины растворимы в воде.

При подкислении несколькими каплями конц. HCl эта прозрачная жидкость теряла желтую окраску и наблюдалось выпадение хлопьевидного осадка, т.к. при замыкании лактонного кольца, образовавшиеся кумарины не растворимы в воде.

Диазореакция

В пробирку наливали 2 мл спиртового извлечения и 3 мл 10 % спиртового р-ра NaOH. Жидкость нагревали до кипения и охлаждали. Затем в пробирку приливали 3 капли свежеприготовленного диазотированного пара-нитроанилина.

Образовалось вишнево-красное окрашивание, свидетельствующее о положительной реакции.

Качественные химические реакции на флавоноиды

Приготовление извлечения

0,25 г смеси пыльцы поместили в колбу емкостью 25 мл, прилили 2,5 мл 70% спирта, настаивали 24 часа. После охлаждения, извлечение профильтровали в пробирку.

Реакции окрашивания:

Цианидиновая проба (восстановление флавонолов, флавонов, флавоноидов до антоцианидинов).

В пробирку помещали 1 мл извлечения, добавляли 3 капли конц. HCl и 10 г (1-2 гранулы) металлического цинка. Нагревали на кипящей водяной бане. Наблюдала красное окрашивание.

Реакция с раствором едкой щелочи.

К 1 мл извлечения добавляли 3 капли 5 % спиртового раствора NaOH. Наблюдала желтое окрашивание

Реакция комплексообразования с хлоридом алюминия.

К 1 мл извлечения добавляли 2 капли 2 % спиртового раствора хлорида алюминия. Наблюдала желтое окрашивание, флюоресцирующее в УФ-свете.

Реакция осаждения раствором основного ацетата свинца:

К 1 мл извлечения добавляли 3 капли раствора основного ацетата свинца. На-

блюдали образование желто-оранжевого осадка.

Качественные химические реакции на дубильные вещества

Приготовление извлечения

0,5 г сырья смеси пыльцы помещали в колбу емкостью 250 мл, приливали 25 мл горячей воды и нагревали на кипящей водяной бане 20 мин. Извлечение охлаждали и процеживали через вату.

Реакции осаждения

К 2 мл извлечения прибавляли по каплям 1% р-р желатина. Появлялась муть, исчезающая при добавлении избытка желатина.

К 2 мл извлечения прибавляли несколько капель 1% р-ра хинина гидрохлорида - появлялся аморфный осадок.

Реакция окрашивания

К 2 мл извлечения прибавляли 4 капли 1% р-ра железосамонийных квасцов. Появлялось черно-синее окрашивание.

Качественные химические реакции на алкалоиды.

Приготовление извлечения

0,5 г сырья смеси пыльцы помещали в колбу емкостью 25 мл, приливали 5 мл 1% р-ра соляной кислоты и нагревали на кипящей водяной бане 5 мин. Извлечение охлаждали и профильтровали в пробирку.

Реакции осаждения алкалоидов

На предметное стекло с помощью стеклянной палочки наносили 2 капли полученного извлечения и рядом каплю реактива. При слиянии капель реактива и извлечения наблюдали появление мути или осадка.

Провели качественные реакции со следующими реактивами:

- с реактивом Бушарда ($KI + I_2$) – бурый осадок;
- с реактивом Драгендорфа ($KI + BiI_3$) – кирпично-красный осадок;
- с раствором танина - желтоватый осадок;
- с раствором кремне-вольфрамовой кислоты - белый осадок;
- с раствором фосфорно-молибденовой кислоты - желтоватый осадок;
- с раствором пикриновой кислоты - желтый осадок.

Таким образом, рекомендуемая влажность для смеси пылицы не более 4% (см. табл. 2,3).

Обнаружение сапонинов.

При взбалтывании водного извлечения образование пены не наблюдалось, что говорит об отсутствии сапонинов.

Обнаружение антраценпроизводных.

Сублимация: на дно сухой пробирки помещали 0,1 г смеси пылицы и осторожно нагревали на спиртовке, держа пробирку почти горизонтально. После остывания на сублимат наносили 2 капли 5% спиртового раствора гидроксида натрия. Щелочной раствор приобретал желтый цвет, что говорит об отсутствии антраценпроизводных.

Определение влажности пылицы

Влажность определялась двумя способами: первый - по известной методике ГФ XI в сушильном шкафу при температуре 38 – 41°C, второй - при комнатной температуре.

Методика определения влажности пылицы при комнатной температуре позволяла полностью исключить инактивацию при повышенных температурах белков, которые являются аллергенами. Для этого две навески по 3 гр., взвешенные с погрешностью $\pm 0,0005$, помещали на бумагу, не впитывающую влагу (рентгеновскую плёнку) и оставляли в сухом месте при комнатной температуре. Высушивание до постоянной массы. Перед взвешиванием помещали пыльцу в предварительно высушенный и взвешенный бюкс без крышки, ставили в эксикатор на 1 час с сорбентом (безводный CaCl_2).

Влажность определяли по формуле ГФ XI:

$$W = \frac{(m - m_1) * 100}{m_1},$$

где m – масса навески до высушивания
 m_1 – масса навески после высушивания

Данные, полученные обеими методиками не отличались друг от друга ($p > 0.05$, где p – уровень значимости). (Программа Statistica 6.0).

Определение золы в сырье

Определение золы в пылице древесных растений проводили согласно методике ГФ XI. Данные представлены в таблице 4.

Достоверных отличий в содержании общей золы и золы, нерастворимой в растворе хлористоводородной кислоты, во всех исследуемых образцах не наблюдали ($p > 0.05$). Таким образом, рекомендуемое содержание золы общей в сырье пылицы не более 4%, золы, нерастворимой в растворе хлористоводородной кислоты, – не более 0,5%.

Количественное определение белков.

Проводилось с помощью метода Бредфорда. Навеску смеси пылицы (6 г) заливали 200 мл жидкости Кока (фосфатный буфер с 4% фенола) и экстрагировали при постоянном встряхивании 48 часов. Фильтровали через бумажный и марлевый фильтры.

В основе метода Бредфорда лежит способность красителя кумасси G –250 связываться с белками и при этом изменять свой спектр поглощения в видимой области: максимум поглощения смещается с 465 нм до 595 нм. Измерение оптической плотности при 595 нм позволяет определить концентрацию белка в образце.

К 0.1 мл экстракта добавляли 5 мл реактива (0.01% водный раствор кумасси G – 250, содержащий 4.7 % этанола и 8.5% ортофосфорной кислоты) и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм. Контролем служила проба, содержащая 0.1 мл соответствующего раствора без белка.

Концентрацию белка определяли по предварительно построенному калибровочному графику (по бычьему лиофилизированному альбумину). На основании статистической обработки данных построено уравнение для определения концентрации белка:

$$Y = 0,0044 x + 0,0282,$$

где Y – оптическая плотность исследуемого раствора,

х – концентрация белка.

Пересчет на белковый азот проводили по общепринятой методике ГФХ1: в 6.25 г белка содержится 1 г белкового азота. Стандартизация аллергенов проводится по PNU (Protein Nitrogenic Unit) (1): 1 PNU равен 0,00001 мг/мл белкового азота.

Установлено, что стандартная степень аллергенной активности пыльцы является 10000 PNU в 1 мл 3% водно-солевого экстракта. Полученные нами данные указывают, что предлагаемая смесь пыльцы, собранной в различных регионах республики, обладает высокой степенью аллергенной активности: от 21830 PNU до 22770 PNU в 1 мл экстракта (см. табл. 5).

ВЫВОДЫ

Фармакогностический анализ смеси пыльцы древесных растений, состоящей из равных частей пыльцы ольхи, берез, лещины обыкновенной и сосны обыкновенной позволил установить следующие показатели подлинности и доброкачественности сырья:

1. Сырье представляет собой желтый, сыпучий, пылеобразный порошок без запаха.
2. При микроскопической диагностике, наряду с видоспецифическими признаками пыльцы указанных растений, следует учитывать морфологически измененные пылевые зерна, составляющие до 21% всей пыльцы.
3. Сушку свежесобранной пыльцы целесообразно проводить при комнатной температуре для сохранения основных аллергенных белков до значения влажности не более 4%.
4. Содержание золы общей в смеси пыльцы – не более 4%. Золы, нерастворимой в растворе хлористоводородной кислоты, – не более 0,05%.
5. Качественными реакциями установлено наличие в смеси пыльцы флавоноидов, дубильных веществ, алкалоидов, кумаринов и отсутствие сапонинов и антраценпроизводных.
6. Содержание белкового азота в смеси пыльцы составляет от 2.183 мкг в мл до

2.277 мкг в мл, что соответствует 21830 PNU и 22770 PNU и указывает на высокую степень аллергенной активности исследуемой пыльцы (стандартный показатель - 10000 PNU).

ЛИТЕРАТУРА

1. Астафьева Н.Г., Горячкина Л.Д. Специфическая иммунотерапия atopических заболеваний. РМЖ. Т.10 № 16. 2002, с.16.
2. Гурина Н.С. Ботанические аспекты изучения поллинозов: дис. д.б.н.: 03.00.05. – Москва, 1994; - 297 с.
3. Гурина Н.С. Новые критерии в изучении поллинозов/ Н.С. Гурина, Т.С. Колосова, Э.А. Доценко// Актуальные проблемы экологической и клинической иммунологии: Материалы 2 Пленума Бел, науч. о – ва иммунологов и аллергологов. – Минск, 1995. – Ч.1. – С. 104 – 104.
4. Гурина Н.С. Усовик О.В. Ботанические аспекты поллинозов / 40 лет фарм. ф – ту: Сб. науч. тр. – Витебск, 1990. – С. 99 – 104.
5. Доценко Э.А. Поллиноз / Доценко Э.А., Гурина Н.С., Д.К. Новиков, Т.С. Колосова // Здоровоохранение. – 2001. - № 2, - С. 35 – 39.
6. Коноплева М.М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества. Витебск, 2002.
7. Новиков Д.К. и др. Краевые аллергены в диагностике и лечении поллинозов в Беларуси/ Д.К. Новиков, Н.С. Гурина, Л.И. Литвякова // Актуальные проблемы экологической и клинической иммунологии: Материалы 2 Пленума Бел, науч. о–ва иммунологов и аллергологов. – Минск, 1995. – С. 110 – 113.

SUMMARY

Gurina N.S.
PHARMACOGNOSY STUDY OF POLLEN
GRAINS AS SOURCE OF THE ALLERGENS.

Microscopic propertis of pollen grains, moister, microelements contens and biological active substances were study.

Таблица 1. Содержание морфологических разновидностей пыльцевых зёрен (%)

	Минск	Брест	Гомель	Гродно	Могилев	Витебск	Всего
Норм.	80.02±2.08	78.15±3.01	77.13±2.81	86.19±2.09	79.14±2.03	81.03±2.93	80.37±2.01
Морф. измен.	18.04±2.31	20.00±0.85	20.00±2.87	13.00±0.81	19.00±1.86	17.00±1.97	18.00±1.63

Таблица 2. Определение влажности по методике ГФ Х1

	Опыт 1	2	3	4	M±σ
	влажность				
Минск	3.8%	3.89%	3.75%	3.70%	3.79±0.08
Витебск	3.5%	3.60%	3.55%	3.60%	3.56±0.05
Гомель	3.33%	3.40%	3.45%	3.50%	3.42±0.07
Гродно	3.71%	3.40%	3.40%	3.38%	3.50±0.15
Могилёв	3.58 %	3.57%	3.53%	3.54%	3.56±0.08

Таблица 3. Определение влажности при комнатной температуре

	1	2	3	4	m±σ
	влажность				
Минск	3.75 %	3.65%	3.80%;	3.65%	3.69±0.05
Витебск	3.40%	3.50%	3.45%	3.60%	3.49±0.09
Гомель	3.59%	3.50%	3.35%	3.40%	3.46±0.11
Гродно	3.64%	3.71%	3.75%	3.59%	3.67±0.07
Могилёв	3.59%	3.59%	3.58%	3.56%	3.57±0.04

Таблица 4. Определение зольности

Пыльца	1 опыт	2 опыт	3 опыт	4 опыт	m±σ
	Общая зола				
Минск	3.69%	3.62%	3.60%	3.65%	3.64±0.04
Витебск	3.71%	3.74%	3.70%	3.65%	3.70±0.04
Гомель	3.55%	3.61%	3.60%	3.63%	3.60±0.03
Гродно	3.82%	3.90%	3.88%	3.79%	3.85±0.05
Могилев	3.69%	3.71%	3.69%	3.68%	3.69±0.04
	Зола. нерастворимая в HCl				
Минск	0.15%	0.18%	0.17%	0.15%	0.16±0.02
Витебск	0.12%	0.11%	0.13%	0.12%	0.12±0.01
Гродно	0.22%	0.20%	0.19%	0.21%	0.21±0.01
Гомель	0.18%	0.24%	0.25%	0.20%	0.22±0.03
Могилев	0.17%	0.18%	0.18%	0.17%	0.18±0.02

Таблица 5. Содержание белкового азота в пробах смеси пыльцы

	2001	2002	2003	m±σ
Минск	2.180	2.21	2.16	2.183±0.025
Витебск	2.310	2.280	2.24	2.277±0.035
Гомель	2.160	2.200	2.195	2.185±0.022
Гродно	2.184	2.205	2.21	2.200±0.014
Могилёв	2.185	2.224	2.194	2.201±0.020